

实 验 报 告

实验名称：流式细胞术检测巨噬细胞标志物 CD206

实验内容：流式细胞术检测巨噬细胞标志物 CD206

实验周期：20XX 年 XX 月 XX 日～20XX 年 XX 月 XX 日。

实验单位：潮新（南京）生物科技有限公司。

项目负责人：XXX

联系电话：XXX-XXXX-XXXX

电子邮箱：xxxxxxxxxxx@chaoxinbio.com

技术负责人：XXX

联系电话：XXX-XXXX-XXXX

电子邮箱：XXX@chaoxinbio.com

报告人：XX 审核人：XX 报告日期：20XX 年 XX 月 XX 日

1. 实验材料

1.1 细胞

大鼠软骨细胞（武汉普诺赛，CP-R087， 5×10^5 cells/T25 培养瓶）

1.2 主要试剂

试剂名称	生产厂家	货号
DMEM 高糖培养基	武汉，普诺赛	PM150210
胎牛血清（FBS）	武汉，普诺赛	164210
青霉素-链霉素溶液	武汉，普诺赛	PB180120
0.25%胰蛋白酶	武汉，普诺赛	PB180225
磷酸盐缓冲液（PBS）	武汉，普诺赛	PB180327
无水乙醇	上海，国药集团	10009218
ANNEXIN V- FITC/PI 凋亡检测	北京，索莱宝	CA1020
IL-1 β	美国，MCE	HY-P73900

1.3 主要仪器设备

仪器设备名称	生产厂家	型号
超纯水仪	美国，Millipore	Milli-Q synthesis
4℃冰箱	青岛，海尔集团	BCD-416
-80℃超低温冰箱	美国，ThermoFisher	ULTS1368
高压灭菌锅	西安，仪创仪器	BXM-30R
二氧化碳培养箱	美国，ThermoFisher	3131
倒置相差显微镜	日本，Olympus	CKX31
生物安全柜	苏州，苏净安泰	1304IIB2
液氮罐	成都，金凤	YDS-120-216
流式细胞仪	美国，BD	Accuri C6 Plus

2. 实验方法

2.1 实验分组

(1) 空白对照组

(2) ...

(3) ...

(4) ...

2.2 细胞培养

(1) 待细胞汇合度达到 70~90%时，弃掉培养瓶中的原培养基，加入无菌的 PBS 冲洗两次，加入 1 mL 的 0.25%胰酶，37℃孵育 1min。

(2) 显微镜下观察到大量细胞呈圆形状态时，立即加入两倍胰酶量含血清的培养基，终止胰酶消化，倾斜培养皿或培养瓶，自上而下吹打，使未脱落的细胞脱离。

(3) 将培养瓶的液体转移到灭菌的 15 mL 离心管中，1000 rpm 离心 5 min。

(4) 将离心管上清液去掉，加入新鲜的培养基吹打均匀，使重悬于培养基中。

(5) 细胞计数：取少量细胞悬液，将细胞悬液滴入盖有盖玻片的血细胞计数板中间平台两侧的沟槽中，使细胞悬液充满盖玻片与计数板间（不要有气泡），静置 2~3 min，通过显微镜计算四个大方格（由 4×4 的小方格组成）中的细胞，计算细胞总量。

注：计算公式：细胞数/ml=（四大格细胞总数/4）×10⁴。

2.3 流式凋亡检测

(1) 使用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞，待细胞可以被枪头吹下时，加入含血清的培养基中止消化。

(2) 1500rpm 离心 5min，去掉上清，加入 PBS 清洗一次，再次离心收集细胞。

(3) 取 100 μ L 的细胞悬液，加入 5 μ L Annexin V/FITC 混合细胞悬液，避光孵育 5min。

(4) 加入 5 μ L 的碘化丙锭溶液（PI），并加 400 μ L PBS，立即上机进行检测。

2.4 结果判定

(1) 将所得到的流式数据在分析软件 FlowJo 上进行分析，凋亡率=早期凋亡（Q4）+晚期凋亡（Q2）

2.5 数据处理及统计学方法

以上实验进行三次生物学重复，实验所得计量数据采用“平均数 $\pm$ 标准误（Mean $\pm$ SEM）”表示。使用 GraphPad Prism 8.0 软件（USA，GraphPad Software）对所有数据进行统计分析、可视化作图。样本间的比较采用单因素方差（One-Way ANOVA）检验， $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。



3. 实验结果

3.1 流式细胞凋亡

如图为流式凋亡结果，图 A 为流式散点图，图 B 为数据处理后的统计分析，由图可以得知，相比对照组，IL-1 β 处理的软骨细胞凋亡率显著提升。而通过 exo 干预的 IL-1 β 处理组，则有所缓和，其中提前对细胞使用 exo 预处理的效果则更好。

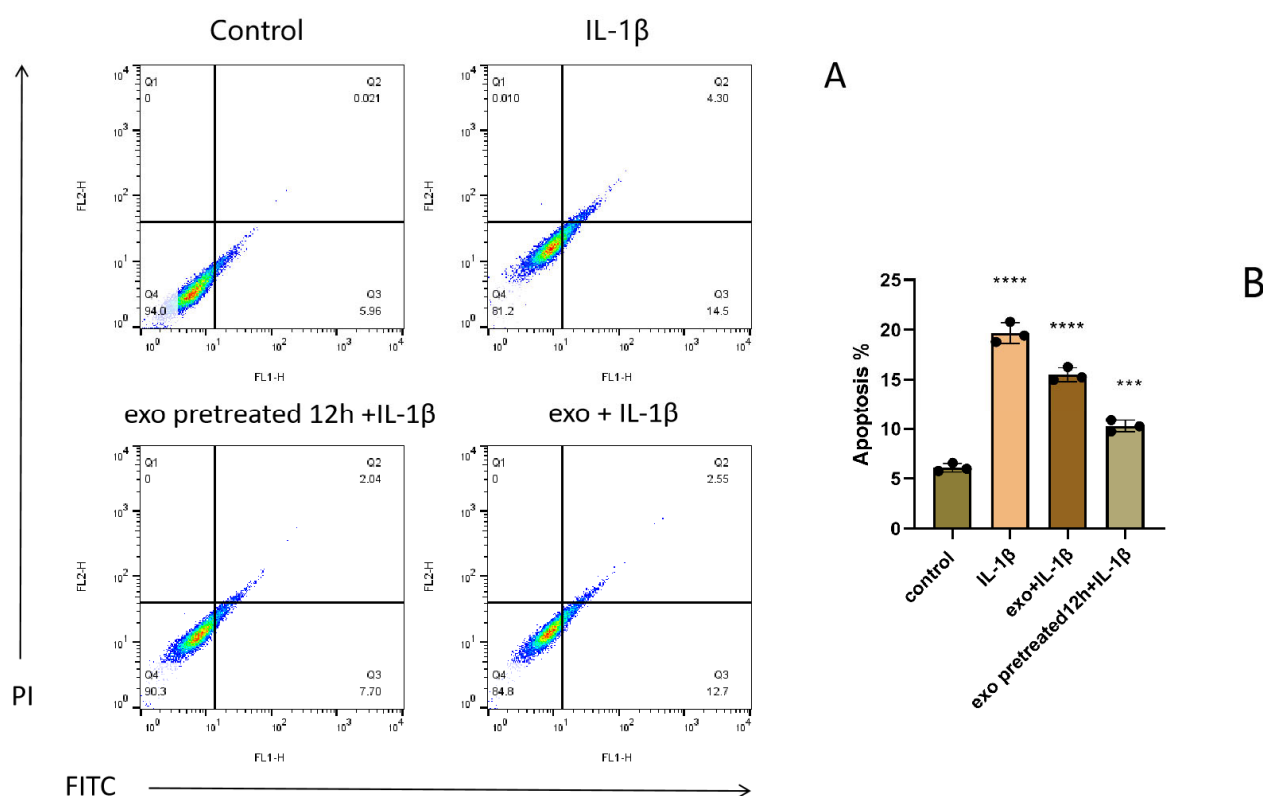


图 1 不同组别软骨细胞流式凋亡结果结果 (** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$, ns, $P > 0.05$, $n=3$)